云 南 植 物 研 究 2009, 31 (3): 260～264
Acta Botanica Yunnanica DOI: 10.3724 SP.J.1143.2009.08221

# 盐胁迫下盐桦生理响应的变化分析

张海波, 曾幼玲**, 兰海燕, 张富春
(新疆大学生命科学与技术学院 新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830046)

**摘要**: 对组织培养获得的盐桦 (*Belula halophila*) 苗在盐胁迫下的生理指标和解剖结构进行了分析, 结果显示, 随着盐浓度的增加, 植物叶片相对含水量逐渐降低; 脯氨酸 (Pro) 含量逐渐增加; 叶片丙二醛 (MDA) 含量和过氧化氢酶 (CAT) 活性大小存在相关性, 在 50～200 mmol L 盐胁迫下, 植物的 CAT 活性是递增的, 200 mmol L NaCl 处理时达到最高, 同时叶片 MDA 含量在 50～200 mmol L 盐处理时变化不明显; CAT 活性在 300 mmol L NaCl 处理时突然降低, 此时叶片 MDA 含量大; 植物叶片和根的离子含量测定表明, 在盐胁迫下 $K^+$ $Na^+$ 比值逐渐降低, 叶片中 $K^+$ 含量始终高于 $Na^+$ 含量; 石蜡切片和扫描电镜发现盐桦茎、叶中有晶体状物质存在, 通过 X-ray 分析表明这种晶体含有 C, O, Ca 元素, 相关的细胞成分化学实验进一步确定其结晶体的成分。

**关键词**: 盐桦; 脯氨酸; 丙二醛; 过氧化氢酶
**中图分类号**: Q 945 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253-2700 (2009) 03-260-05

# Physiological Responses of *Betula halophila* (Betulaceae) to Salt Stress

ZHANG Hai-Bo, ZENG You-Ling**, LAN Hai-Yan**, ZHANG Fu-Chun
(*Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University*, Urumqi 830046, China)

Abstract: The physiological responses and the relevant anatomical structure of *Betula halophila* under salt stress were assayed. Results showed that the relative water and proline contents of the leaf were gradually declined, while the MDA content was correlated with the CAT activity in the leaf under salt stress. The CAT activity was ascended responding to the stability of MDA content at 50-200 mmol L NaCl, but it was decreased at 300 mmol L NaCl, which caused the elevation of the MDA. The $K^+$ $Na^+$ ratios in the leaf and root were declined under salt stress, while the $K^+$ content was always higher than $Na^+$ content in leaf. Crystals of *Betula halophila* containing the C, O and Ca element were discovered in the stem and leaf, but not in root, and will be further confirmed by chemical experiment related to cell components.

Key words: *Betula halophila*; Proline; MDA; CAT

植物耐盐性是一个十分复杂的数量性状, 其耐盐机制涉及从植株到器官、组织、生理生化直至分子的各个水平。不同植物由于其耐盐方式和耐盐机理的不同, 其组织或细胞的生理代谢和生化变化也不同, 所以对植物耐盐性的研究, 应该是综合多项指标。当植物受到盐胁迫时, 细胞内主动积累一些小分子有机化合物和蛋白类保护剂来维持渗透平衡和体内水分, 一般称之为渗透调节剂 (Osmoprotectant), 如脯氨酸 (Proline) 和甜菜碱 (Betaine), 它们可以作为渗调剂、酶的构型保护剂, 保护质膜的完整性, 是无毒的细胞质调渗物质, 对代谢无抑制作用。植物的膜系统主要

基金项目: 教育部春晖计划项目 (Z2004-2-65036); 自治区重点实验室开放课题 (XJDX 0201-2004-04); 新疆大学博士启动基金 (BS05010)
通讯作者: Author for correspondence; E-mail: zengyouling@xju.edu.cn; lanhaiyan@xju.edu.cn; Tel: 0991-8583259
收稿日期: 2008-12-10, 2009-03-25 接受发表
作者简介: 张海波 (1982-) 男, 汉族, 硕士, 生物化学与分子生物学专业。E-mail: zhbneble@163.com

是由膜脂和膜蛋白组成，当植物受到盐胁迫时，体内会产生大量的氧自由基，即活性氧，从而引起膜脂的氧化伤害。植物体内存在有抗氧化的过氧化酶系统，当受盐胁迫时，过氧化酶系统活动加强，以清除过多的活性氧（Bowler 等，1991）。

盐桦（*Betula halophila*）属桦木科桦木属小灌木，已被列入《全国重点保护野生植物资源调查名录》，属于国家II级保护植物。生长于潮湿盐碱地及盐沼泽附近，是西北地区盐碱地及湿地造林的优良树种。调查发现，我国约有 500 余种盐生植物，其中木本植物所占比例稀少，盐桦是其中十分耐盐的树种，在改造和利用盐渍土方面，将是优良的候选树种之一（王健，2003）。关于盐桦耐盐的研究未见报道，而且通过组织培养获得盐桦苗是否保持了野生盐桦的耐盐特性也未研究过，本研究通过盐桦在不同盐浓度下，通过耐盐生理指标的测量，结合植物解剖学特征来揭示组织培养盐桦苗的耐盐阈值及可能的耐盐机理，为更加科学合理地应用盐桦来绿化新疆盐碱地奠定了理论基础。

## 1　材料与方法

### 1.1　植物培养和 NaCl 处理

濒危植物盐桦来自本实验室的组培幼苗，组培材料采自新疆阿勒泰盐沼泽地。通过组织培养获得盐桦苗，移栽到蛭石∶珍珠岩（3∶1）的花盆中，花盆底部是稍大的托盘用于盛水，用 1 2 Hongland 营养液及自然光照下培养。幼苗长至 20 cm 左右时进行 0，50，100，200，300，500 mmol L NaCl 处理，盐浓度每 12 h 递增 100 mmol L，直至终浓度，两星期后收集植物叶片和根。

### 1.2　植物叶片相对含水量的测定

叶片相对含水量（Wr）测定：取 0，100，300，500 mmol L NaCl 处理的植物叶片迅速放入已知重量的干燥培养皿中，称重量得原始鲜重（Wf），然后浸入蒸馏水中 6～8 h，取出，吸水纸吸干叶片表面水分，称重后再浸 1 小时，吸干水分，称重，直至样品饱和水重量近似，即得饱和鲜重（Wt），最后置于 105℃，杀青 15 min，80℃烘至恒重，称干重（Wd），重复实验 3 次，数据平均得各浓度盐处理叶片相对含水量。

相对含水量（Wr）=（原始鲜重 Wf—干重 Wd）（饱和鲜重 Wt—干重 Wd）×100%。

### 1.3　$Na^{+}$、$K^{+}$、$Ca^{2+}$，脯氨酸（Pro）和丙二醛（MDA）含量的测定及过氧化氢酶活性（CAT）测定

植物叶片中 $Na^{+}$、$K^{+}$、$Ca^{2+}$ 含量的测定采用原子吸收光谱法；脯氨酸和丙二醛含量的测定分别采用酸性茚三酮法和硫代巴比妥酸法（郝再彬等，2004）；过氧化氢酶活性的测定采用紫外吸收法（邹琦，2000）。

### 1.4　数据分析

实验均重复 3 次，所测数据平均得各浓度盐处理相对含水量，$Na^{+}$、$K^{+}$、$Ca^{2+}$，Pro 和 MDA 含量。采用 SPSS 13.0 统计分析软件对数据进行差异显著性检验，$P<0.05$ 为差异显著，$P<0.01$ 为差异极显著。采用 Tukey 检验进行多重比较，确定处理项两两之间的差异显著水平。采用 Excel 2000 软件制图。

### 1.5　植物显微结构的观察

选取长势一致的盐桦苗，高度大约为 20 cm，进行 200 mmol L 的 NaCl 胁迫，蒸馏水作为对照，胁迫 10 d 后分别取胁迫和未胁迫的盐桦苗根、茎、叶，按常规步骤制作石蜡切片。同时取盐桦叶片和茎，经过 70%、80%、100%的乙醇脱水后，液氮骤冷，刀片横切样品后用扫描电镜（SEM）观察，检索到叶片及茎中的结晶状物质后，通过 X-Ray 能谱仪测定晶体成分。

## 2　结果与分析

### 2.1　NaCl 胁迫对盐桦叶片含水量变化的影响

图 1 所示盐桦幼苗在盐胁迫下，随着盐浓度的提高，植物失水越来越多，相对含水量逐渐降低，没有盐处理时植物的相对含水量接近 80%，在 300 mmol L 时降低至 50%。除 300 和 500 mmol L 盐处理之间外，其它各浓度盐处理之间的相对含水量差异显著。

### 2.2　NaCl 胁迫对盐桦叶片 Pro，CAT，MDA 的影响

如图 2 所示，植物在逆境条件下会积累较多的 Pro，盐桦在盐胁迫下，植物 Pro 的积累逐渐增多，而且各浓度梯度之间 Pro 含量差异显著。图 3 显示植物体内 CAT 含量的变化为先增高再降低，200 mmol L NaCl 胁迫时 CAT 活性最高，300 mmol L NaCl 胁迫时植物 CAT 酶活性突然降低，50 mmol L 和 300 mmol L 之间 CAT 活性差异不显著，其它各浓度盐处理之间的 CAT 活性差异都显著，100 mmol L 和 200 mmol L 与其它各浓度之间差异极显著；MDA 的值随着盐浓度的升高而增高，在 0～200 mmol L NaCl 胁迫时变化不显著，300 mmol L NaCl 胁迫时突然升高（图 4），并且与其它各浓度之间的差异显著。

### 2.3　植物盐胁迫下 Na、K、Ca 离子含量的测量

植物根和叶中的 $Ca^{2+}$ 含量较高，随着盐浓度的增加，$Ca^{2+}$ 含量逐渐增高，叶中可达到 23 mg

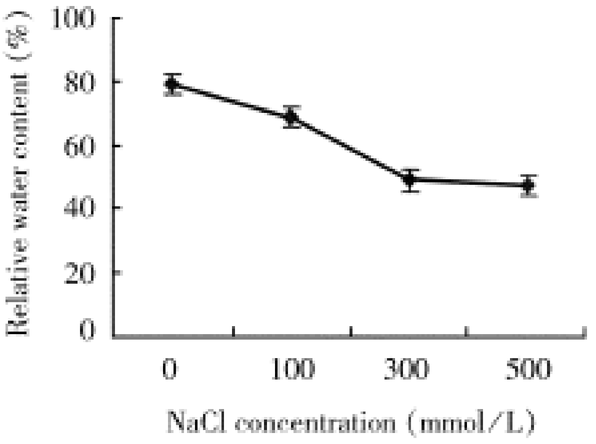



图 1 盐胁迫下盐桦叶片相对含水量的变化

Fig . 1 Changes of relative water content in the leaf of *B. halophila* under salt stress

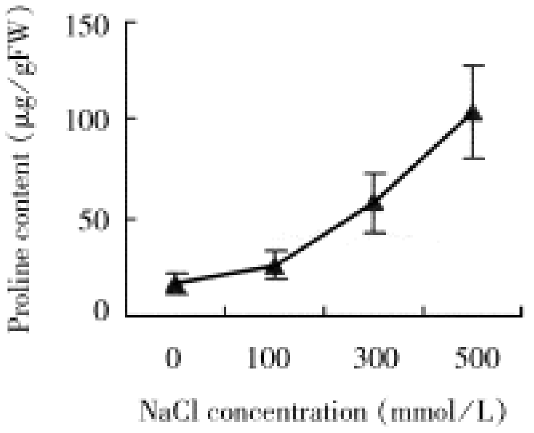



图 2 盐胁迫下叶片脯氨酸含量的变化

Fig . 2 Changes of Pro content in the leaf of *B. halophila* under salt stress

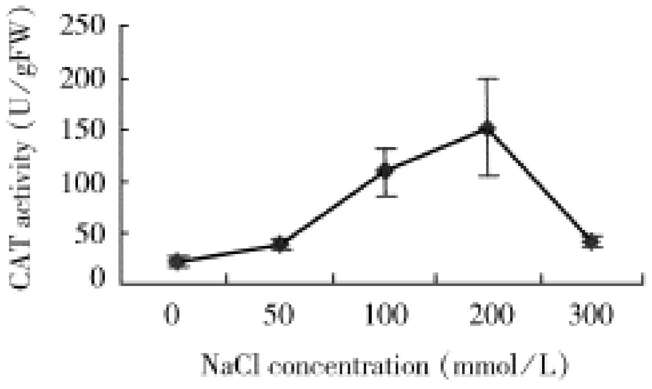



图 3 盐胁迫下叶片 CAT 活性的变化

Fig . 3 Changes of CAT content in the leaf of *B. halophila* under salt stress

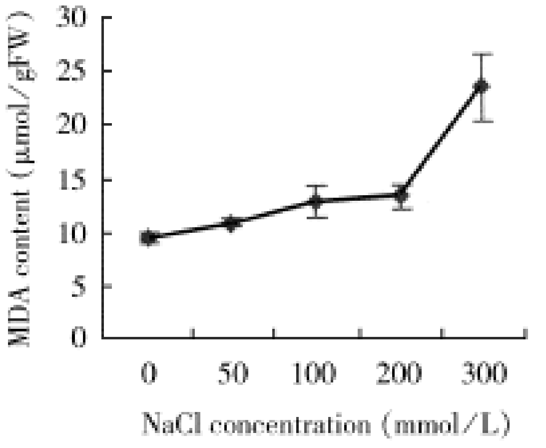



图 4 盐胁迫下叶片 MDA 含量的变化

Fig . 4 Changes of MDA content in the leaf of *B. halophila* under salt stress

以上，叶中除 300 和 500 mmol L 之间，其它浓度之间 $Ca^{2+}$ 含量差异显著，根部可达到 19 mg，0 mmol L 和盐处理之间差异显著，但是盐处理之间差异不显著；$K^{+}$ 在叶中含量较高，100 mmol L NaCl 处理下达到峰值为 20 mg，和其它处理的差异显著，根中 $K^{+}$ 含量偏低，0 mmol L 和盐处理之间差异显著，但是盐处理之间差异不显著；$Na^{+}$ 含量在根中较稳定，它们之间差异不显著，叶中 $Na^{+}$ 含量在盐胁迫下逐渐升高，在 300 mmol L 时达到峰值为 8.4 mg，和其它处理比较差异显著。从 $K^{+}$ $Na^{+}$ 的关系看，根和叶中 $K^{+}$ $Na^{+}$ 比值均是随着盐胁迫逐渐降低 (如图 5～7)。

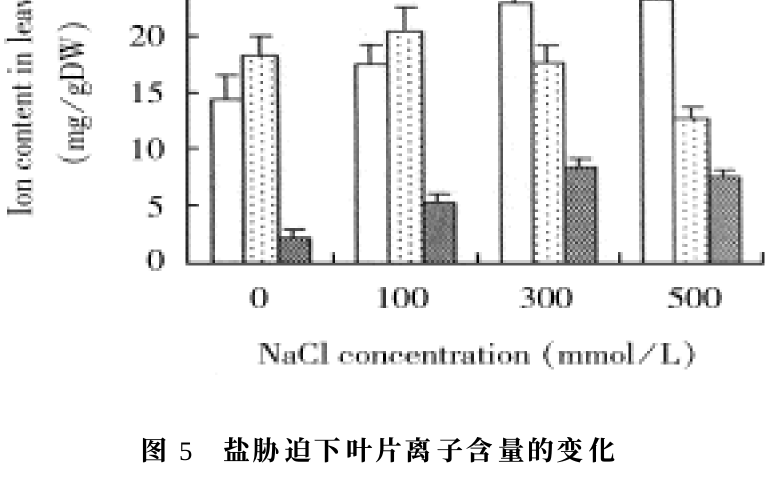



图 5 盐胁迫下叶片离子含量的变化

Fig . 5 Changes of ion content in the leaf of *B. halophila* under salt stress

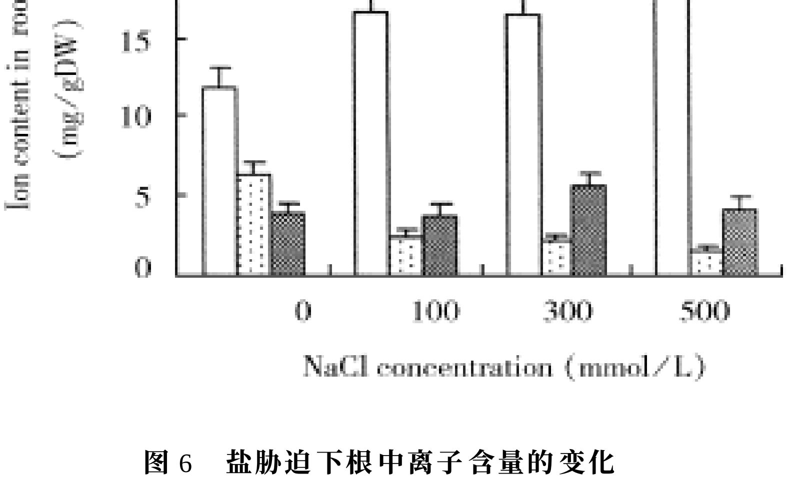



图 6 盐胁迫下根中离子含量的变化

Fig . 6 Changes of ion content in the root of *B. halophila* under salt stress

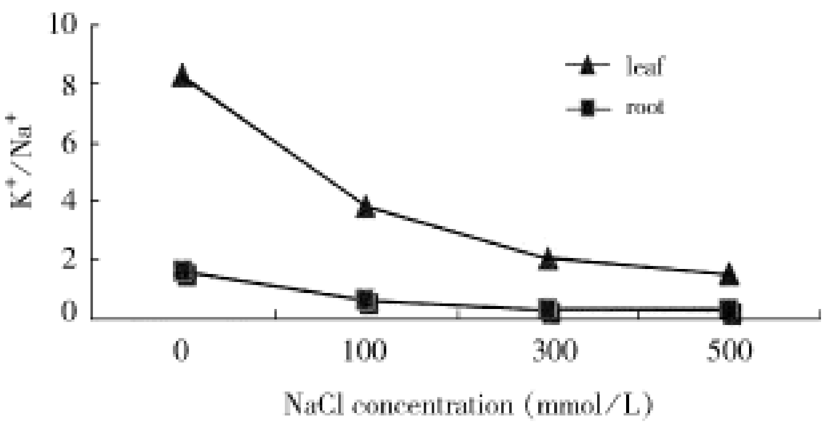
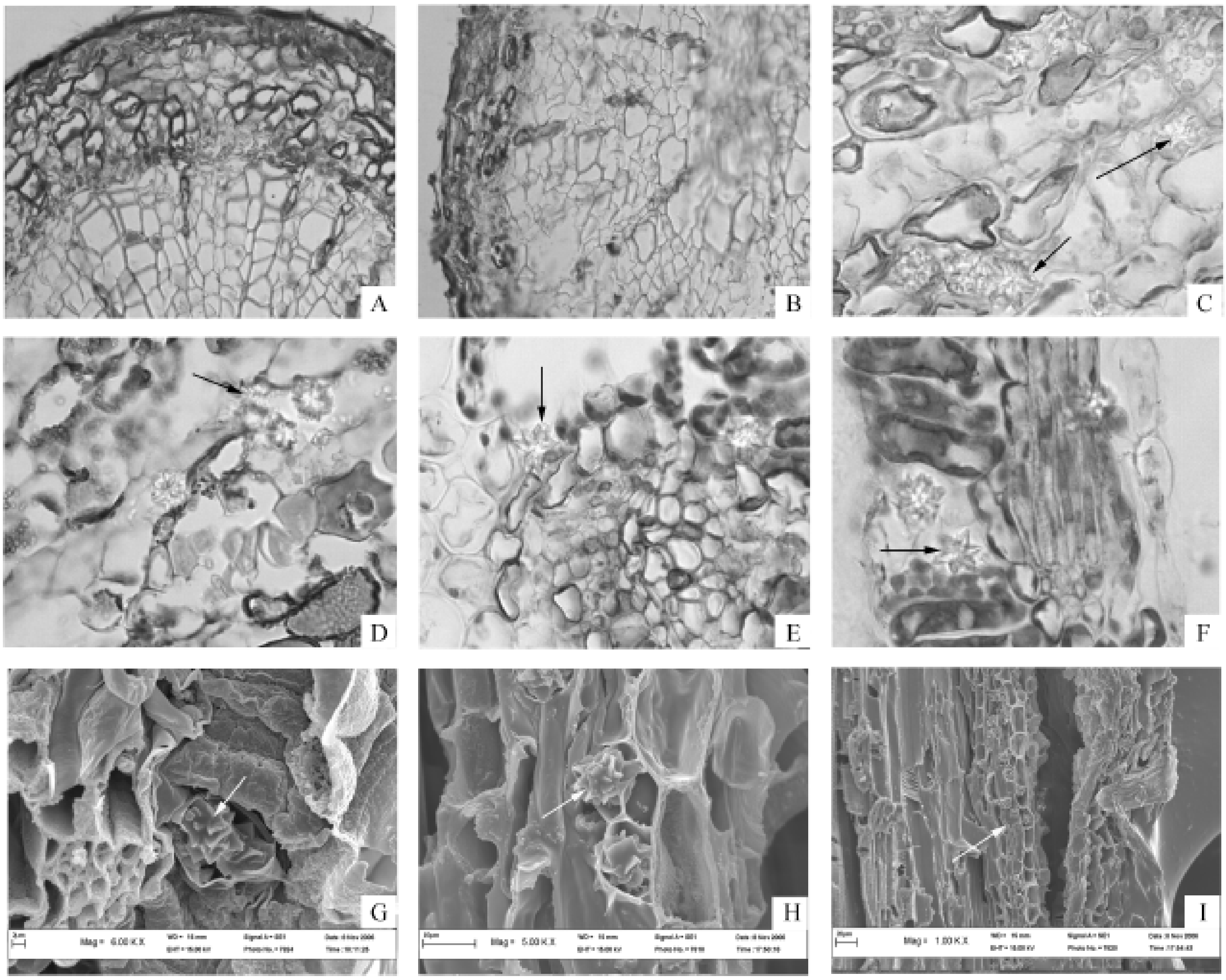



图 7　NaCl 胁迫下，植物根和叶中 $K^+$ $Na^+$ 比值的变化

Fig . 7　Changes of ion ration in the root and leaf of *B. halophila* under salt stress

## 2.4　盐桦显微结构的观察

通过石蜡切片观察发现无论在盐胁迫和非盐胁迫下，植物的茎、叶里面都发现有结晶状物质存在，存在于茎的韧皮部以及叶中靠近维管束周围的组织，在根中没有发现结晶状物质，扫描电镜进一步确认茎中晶体主要是存在于韧皮部薄壁细胞（图 8），而在木质部中没有发现。通过 X-ray 分析表明这种晶体含有 C、O、Ca 元素，推测很可能是草酸钙结晶，还需要进一步通过细胞成分化学实验确定。



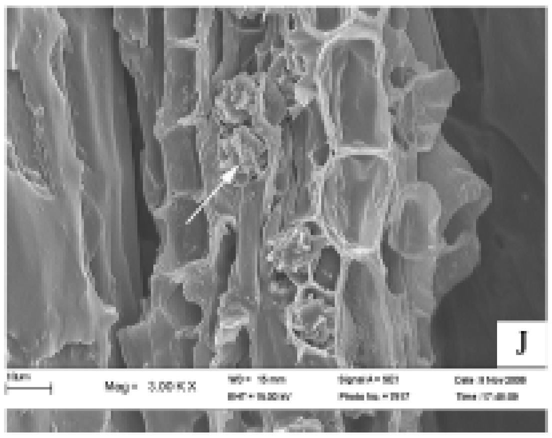




图 8 石蜡切片和扫描电镜观察植物茎和叶片中的晶体

A、C 和 E 未经盐胁迫；B、D 和 F 为盐胁迫。A 和 B 示根部结构；C 和 D 示茎中晶体；E 和 F 示叶中晶体状物质；C–J 为扫描电镜图，G 和 H 示叶晶体；I 和 J 示茎晶体（A、B × 400；C、D、E、F × 1000）

Fig. 8 The crystals in stem and leaf observed with paraffin section and SEM

A, C, E without salt stress; B, D, F under salt stress; A, B show root structure; C, D show crystals in the stem; E, F show crystals in the leaf; G–J show crystals in the plant under scanning electron microscope; G, H show crystals in the leaf; I, J show crystals in stem (A, B × 400; C, D, E, F × 1000)

## 3 讨论

盐桦是新疆阿勒泰地区特有盐生植物种类。野外观察发现在盐桦生长的盐湖周边地面有白色盐结晶，当地生境中仅此一种木本树种，其它种类均为草本植物。在盐胁迫条件下，盐桦的生长受到明显抑制，其主要原因是由于外界盐浓度影响土壤渗透势，造成植物吸水困难，从而导致盐桦生长缓慢，当盐桦幼苗叶片相对含水量小于50%时，盐桦生长即受到很大伤害。从实验结果可以看出，脯氨酸含量与盐胁迫程度成相关性，随着盐胁迫程度加大，植物体内的脯氨酸含量也逐渐增加，表明它可能在帮助植物抵御逆境以及增强耐盐性方面起到重要作用。

植物的耐盐性主要依赖于膜系统的稳定性，即高盐胁迫下仍能保持膜系统的完整并维持对离子的选择吸收和其它功能。膜透性是膜受伤害程度的直接反映，丙二醛（MDA）可间接表示膜受损伤状况并兼有反馈作用。本实验中，MDA 含量与盐胁迫危害程度相关，盐桦苗在高盐 300 mmol L 处理下膜透性大幅度上升，膜系统受到严重的损伤。实验结果显示，在 50～200 mmol L NaCl 处理时，植物 CAT 活性是递增的，300 mmol L 时植物 CAT 活性却显著降低，这时植物 MDA 含量突然增高，MDA 本身对植物细胞有毒害作用，能降低 CAT 的活性，加剧过氧化作用(陈少裕，1991)。因此 MDA 含量的多少可以作为盐桦苗盐胁迫下受到伤害的一个指标。

$K^{+}$ 对盐生植物碱蓬的耐盐性有重要的作用，盐胁迫下，$K^{+}$ 可能参与了 V-$H^{+}$-ATPase 和 V-$H^{+}$-Ppase 活性调节（Li 等，2002）。但在植物受到盐害时，$K^{+}$ $Na^{+}$ 比值由于 $Na^{+}$ 含量的增加而降低，这主要是因为 $K^{+}$ 和 $Na^{+}$ 具有相似的水合离子半径，使得部分运输 $K^{+}$ 的载体亦有运输 $Na^{+}$ 的功能（Blumwald，2000）。随着盐浓度的提高，盐桦对 $Na^{+}$ 的过量吸收，导致植株对 $K^{+}$ 的吸收受到抑制，导致了植物体内 $K^{+}$ $Na^{+}$ 比值的降低，打破了盐桦植株体内正常的离子平衡，使得正常的生理生化代谢受到干扰，这可能是盐胁迫对盐桦植株造成危害的又一重要原因。

草酸钙的形成是植物的一个基本生理过程，它导致体内大量的钙元素成为不活跃的形式（Li 等，2003），草酸钙广泛分布在微生物、植物和动物体内（Mcnair，1932），超过 215 科的植物中发现含有草酸钙的物质（Franceschi and Horner，1998），草酸钙功能假说有稳定离子平衡、植物防御、组织支持物、解毒等功能（Arnott and Pautard，1970）。通过对蒺藜苜蓿（*Medicago truncatula*）功能突变体的研究发现，野生型和不产生草酸钙结晶的突变体（cod 5）在相同的温室环境下生长并没有任何区别，草酸钙晶体的有无对 *M. truncatula* 的正常生长是没有影响的（Paul and Michele，2000）。在盐桦中发现可能是草酸钙的晶体，推测与野生盐桦的生境有关，在盐桦生长的环境中，Ca 盐的含量远远超出了植物生长的需要，因而植物进化出形成钙盐结晶的途径来降低 $Ca^{2+}$ 在植物体内的含量。

## 〔参 考 文 献〕


郝再彬，苍晶，徐仲，2004. 植物生理实验 [M]. 哈尔滨：哈尔滨工业大学出版社，95—113

邹琦，2000. 植物生理学实验指导 [M]. 北京：中国农业出版社，136—142

王健，2003. 新疆发现一种抗盐桦树 [J]. 植物杂志，6：12—13

Arnott HJ，Pautard FG E，1970. Calcification in Plants [A]. In：Schraer H ed，Biological Calcification Cellular and Molecular Aspects [M]. New York：Appleton-Century-Crofts，375—446

Bowler C，Slooten L，Vandenbranden S *et al.*，1991. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants [J]. *EMBO Journal*，10 (7)：1723—1732

Blumwald E，2000. Sodium transport and salt tolerance in plants [J]. *Current Opinion in Cell Biology*，12 (4)：431—434

Chen SY (陈少裕)，1991. Injury of membrane lipid peroxidation to plant cell [J]. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯)，27 (2)：84—90

Franceschi VR，Horner HT，1998. Calcium oxalate crystals in plants [J]. *The Botanical Review*，46：361—427

Mcnair JB，1932. The interrelations between substances in plants：essential oils and resins，cyanogen and oxalate [J]. *American Journal of Botany*，19：255—271

Li PH，Chen M，Wang BS，2002. Efect of $K^{+}$ nutrition on growth and activity of leaf tonoplast V-H-ATPase and V-H-Ppase of *Suaeda salsa* under NaCl stress [J]. *Acta Botanica Sinica*，44 (4)：433—440

Li XX，Zhang DZ，Valerie J *et al.*，2003. Isolation of a crystal matrix protein associated with calcium oxalate precipitation in vacuoles of specialized Cells [J]. *Plant Physiology*，133：549—559

Paul AN，Michele MM，2000. Isolation of medicago truncatula mutants defective in calcium oxalate crystal formation [J]. *Plant Physiology*，124：1097—1104